

95-098

95-48  
BADE4138042 A1 9322  
BASIC 93176369

Z B C D16 E1

DEUTSCHES  
PATENTAMT

B2C2D16

## Offenlegungsschrift

41 38 042 A 1

(1) Aktenzeichen: P 41 38 042.8  
 (2) Anmeldetag: 19. 11. 91  
 (3) Offenlegungstag: 27. 5. 93

(5) Int. Cl.:

C 07 D 493/04

 C 12 P 17/18  
 A 01 N 43/80  
 A 01 N 83/02  
 C 07 G 11/00  
 A 61 K 31/425  
 // (C07D 493/04,  
 303/00)C07D 313/00,  
 277/24 (C12P 17/18,  
 C12R 1/01)

DE 41 38 042 A 1

(1) Anmelder:  
 Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH  
 (GBF), 3300 Braunschweig, DE

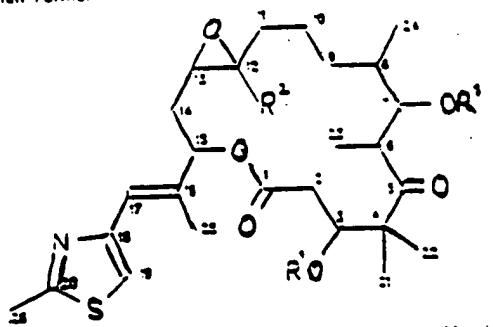
(2) Vertreter:  
 Boeters, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Bauer, R.,  
 Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

(7) Erfinder:  
 Höfle, Gerhard, Prof. Dr.; Bedorf, Norbert, Dr.;  
 Gerth, Klaus, Dr.; Reichenbach, Hans, Prof. Dr., 3300  
 Braunschweig, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(3) Epothilone, deren Herstellungsverfahren sowie sie enthaltende Mittel

(5) Die Erfindung betrifft Epothilone der folgenden allgemeinen Formel



Herstellungsverfahren sowie Epothilone enthaltende Mittel.

R' = H, C1-C6, allyl, C1-C6, cyclo, M+

R2 = H, Me

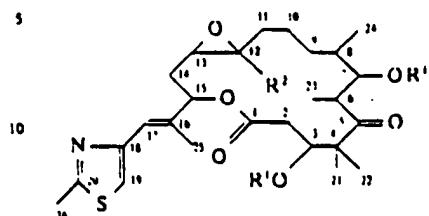
93176369 ACTIVITY

EPOTHILONE DERIVATIVES & OBTAINMENT  
 PRODUCED BY CULTIVATING  
 SORANGIUM CELLULOSUM +  
 FUNGICIDES AND  
 FUNGISTATICS FOR  
 PLANT PROTECTION  
 AND PHARMACEUTICALS  
 WITH CYTOTOXIC AND  
 IMMUNOSUPPRESSIVE

DE 41 38 042 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Epothilone der folgenden allgemeinen Formel:



worin R<sup>1</sup> Wasserstoff, C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub>-Acyl, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, 1/2 Mg<sup>2+</sup> oder 1/2 Ca<sup>2+</sup> bedeutet und R<sup>2</sup> Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

Ferner betrifft die Erfindung eine Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

|    | <sup>1</sup> H-NMR-Daten<br>Atom | <sup>13</sup> C-NMR-Daten<br>Atom |
|----|----------------------------------|-----------------------------------|
| 25 | 2a 2.4                           | 1 170.5                           |
|    | 2b 2.52                          | 2 39.1                            |
|    | 3 4.19                           | 3 73.2                            |
|    | 6 3.2                            | 4 53.0                            |
|    | 7 3.78                           | 5 219.9                           |
| 30 | 8 1.73                           | 6 43.5                            |
|    | 9a 1.4                           | 7 74.7                            |
|    | 9b 1.52                          | 8 36.4                            |
|    | 10a 1.4                          | 9 30.7                            |
|    | 10b 1.4                          | 10 23.6                           |
| 35 | 11a 1.42                         | 11 27.6                           |
|    | 11b 1.7                          | 12 57.4                           |
|    | 12 2.9                           | 13 54.6                           |
|    | 13 3.01                          | 14 31.7                           |
|    | 14a 1.85                         | 15 76.8                           |
| 40 | 14b 2.11                         | 16 137.4                          |
|    | 15 5.41                          | 17 120.1                          |
|    | 17 6.6                           | 18 152.1                          |
|    | 19 6.99                          | 19 116.3                          |
|    | 21*) 1.08                        | 20 165.0                          |
| 45 | 22*) 1.35                        | 21*) 20.4                         |
|    | 23 1.15                          | 22*) 21.6                         |
|    | 24 0.93                          | 23 14.1                           |
|    | 25 2.05                          | 24 17.1                           |
|    | 26 2.69                          | 25 15.6                           |
| 50 |                                  | 26 19.1                           |

\*) Zuordnung vertauschbar.



55 FAB-MS(neg. Ionen): 429.25 für (M-H)<sup>-</sup>  
UV(MeOH)  $\lambda_{max}$  (log e) = 210(4.17); 249(3.97)

IR Film auf Infrarot:  
 $\nu$ : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm<sup>-1</sup>

60 DC: R<sub>f</sub> = 0.75  
DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:  
Dichlormethan/Methanol = 90 : 1

Dektion:

- 65 1. UV-Lösung bei 254 nm
2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120°C, braune Anfärbung.

HPLC: R<sub>t</sub> = 3.4 min

DE 41 38 042 A1

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck;  
Fluß: 1.5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35  
Detektor: UV 254 nm

Des weiteren betrifft die Findung ein Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

| 'H-NMR-Daten |         | 'C-NMR-Daten |                                     |    |
|--------------|---------|--------------|-------------------------------------|----|
| Atom         |         | Atom         |                                     | 10 |
| 2a           | 2.22 dd | 1            | 170.5                               |    |
| 2b           | 2.53 dd | 2            | 39.4                                |    |
| 3            | 4.24 dd | 3            | 72.9                                |    |
| 6            | 3.28 m  | 4            | 53.2                                | 15 |
| 7            | 3.75 dd | 5            | 219.8                               |    |
| 8            | 1.73 m  | 6            | 43.1                                |    |
| 9a           | 1.4 m   | 7            | 74.3                                |    |
| 9b           | 1.5 m   | 8            | 36.6                                |    |
| 10a          | 1.4 m   | 9            | 30.9                                | 20 |
| 10b          | 1.4 m   | 10           | 22.5                                |    |
| 11a          | 1.42 m  | 11           | 32.3                                |    |
| 11b          | 1.7 m   | 12           | 61.3                                |    |
| 12           | -       | 13           | 61.7                                |    |
| 13           | 2.8 dd  | 14           | 32.4                                | 25 |
| 14a          | 1.9 ddd | 15           | 76.9                                |    |
| 14b          | 2.1 ddd | 16           | 137.5                               |    |
| 15           | 5.41 dd | 17           | 120.0                               |    |
| 17           | 6.6 s   | 18           | 152.1                               |    |
| 19           | 6.99 s  | 19           | 116.2                               | 30 |
| 21*)         | 1.05 s  | 20           | 165.1                               |    |
| 22*)         | 1.36 s  | 21*)         | 19.7                                |    |
| 23           | 1.15 d  | 22*)         | 21.5                                |    |
| 24           | 0.92 d  | 23           | 13.7                                |    |
| 25           | 2.05 s  | 24           | 17.1                                | 35 |
| 26           | 2.69 s  | 25           | 15.7                                |    |
| 27           | 1.28 s  | 26           | 19.0                                |    |
|              |         | 27           | 22.7                                |    |
|              |         |              | (R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> ) |    |

\*) Zuordnung vertauschbar

C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>6</sub>S [507]  
FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für (M-H)<sup>-</sup>  
UV (MeOH)λ<sub>max</sub> (log c) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Irtran:  
ν = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm<sup>-1</sup>

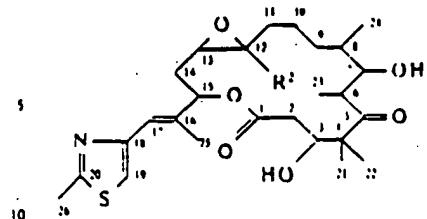
DC: R<sub>f</sub> = 0.75  
DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:  
Dichlormethan/Methanol = 90 : 10  
Detektion:  
1. UV-Lösung bei 254 nm  
2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R<sub>t</sub> = 6.3 min  
Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck;  
Fluß: 1.5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35  
Detektor: UV 254 nm

Besonders bevorzugt sind Epothilone mit der folgenden Strukturformel

3  
93176369

DE 41 38 042 A1



worin R<sub>2</sub> Wasserstoff oder Methyl bedeutet. (Das Kohlenstoffatom der Methylgruppe wird als C27 bezeichnet). Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Gewinnen von Epothilonen, insbesondere der vorstehend charakterisierten Epothilone, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man den Stamm So ce90 DSM 6773

- 15 — in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und
- 20 — die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsstufen von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographic und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreinigt und voneinander trennt.

Gegebenenfalls können die so gewonnenen Epothilone mit gängigen chemischen Verfahren weiter umgesetzt werden, z. B. mit Basen in die Alkali- und Erdalkalisalze überführt und gegebenenfalls weiter zu Ethern umgesetzt werden, oder sie können mit organischen Säuren in die entsprechenden Ester überführt werden.

Ferner betrifft die Erfindung ein Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung ein therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

35 Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und experimentellen Daten näher erläutert.

#### Produktionsstamm

Stamm So ce90 wurde im Juli 1985 an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi, Südafrika, isoliert. Der Stamm ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) unter Nr. 6773 hinterlegt.

Stammkultur und morphologische Beschreibung: Der Stamm wächst auf Cellulose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle mit KNO<sub>3</sub> als einzige Stickstoffquelle, z. B. auf Filterpapier über ST21 Mineralsalzagär (0.1% KNO<sub>3</sub>; 0.1% MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O; 0.1% CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O; 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.01% MnSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O; 0.02% FeCl<sub>3</sub>; 0.002% Hefeextrakt; Standard-Spurenelementlösung; 1% Agar). Auf diesem Medium werden dunkelrotbraune bis schwarzbraune Fruchtkörper gebildet, bestehend aus kleinen Sprangioien (etwa 15 bis 30 µm Durchmesser) in mehr oder weniger großen dichten Haufen und Paketen.

Der Stamm wächst sehr gut mit Glucose und KNO<sub>3</sub>, z. B. auf CA2-Agar (Grundmedium: 1.5 g Agar in 92 ml Aqua dest.; Stammlösung 1: 7.5% KNO<sub>3</sub>, 7.5% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in Aqua dest.; Stammlösung 2: 1.5% MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O in Aqua dest.; Stammlösung 3: 0.2% CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O; 0.15% FeCl<sub>3</sub> in Aqua dest.; Stammlösung 4: 20% Glucose in Aqua dest. Die Stammlösungen werden durch Autoklavieren sterilisiert. Je 1 ml der Lösungen 1 bis 3, sowie 5 ml der Lösung 4 werden dem Grundmedium zugegeben, ebenso eine geeignete Menge einer Spurenelementlösung).

Die vegetativen Stäbchen haben für Sorangium typischen Form (relativ derbe, im Phasenkontrastmikroskop dunkle, zylindrische Stäbchen mit breit abgerundeten Enden, im Mittel 3–6 µm lang und 1 µm dick). Nach längerer Adaptation an das Wachstum in Flüssigmedien wächst der Stamm in homogener Zellsuspension.

Der Stamm So ce90 produziert chemisch nahe verwandte Verbindungen, die antibiotische Aktivität besitzen. Insbesondere sind diese Verbindungen cytotoxisch sowie antifungal wirksam. Hervorzuheben ist z. B. die Hemmung von *Mucor hiemlis*.

#### Produktion der biologisch aktiven Verbindungen

Die Verbindungen werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert. Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l-Fermenter wird mit 60 l Medium (0.8% Stärke; 0.2% Glucose; 0.2% Sojamehl; 0.2% Hefeextrakt; 0.1% MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O; 8 mg/l Fe-EDTA; pH 7.4) gefüllt. Beimpft wird mit 10 l einer im gleichen Medium jedoch zusätzlich mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7.4 in Schüttelkolben angezogenen Vorkultur (160 upm, 30°C). Fermentiert wird bei 32°C mit einer Rührgeschwindigkeit von 500 upm und einer Belüftung von 0.2 NL pro m<sup>3</sup> und Std., der pH-Wert wird durch Zugabe von KOH bei

DE 41 38 042 A1

7.4 gehalten. Die Fermentation dauert 7–10 Tage. Die gebildeten aktiven Verbindungen befinden sich teils im Oberstand und teils in den Zellen.

Alternativ dazu kann in Gegenwart von Adsorberharzen (z. B. XAD-1180, Rohm und Haas, 2–5%) fermentiert werden.

#### Isolierung von Epothilon A und B

Während der Fermentation von Sorangium cellulosum So ce90 (z. B. 70 l Fermentationsvolumen) in Gegenwart eines Adsorberharzes (z. B.: XAD-1180, Rohm und Haas, 2% v/v) werden die gebildeten Antibiotika Epothilon A (Abb. 1) und B (Abb. 2) vollständig an das Harz gebunden. Nach Abtrennung der Kulturbrühe (z. B. durch Absieben in einem Prozeßfilter) wird das Harz mit 3 Bettvolumen Wasser gewaschen und mit 4 Bettvolumen Methanol eluiert. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum bis auf den Wassergehalt eingeengt und dreimal mit je 0,2 l Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatextrakte werden zur Trockne eingeengt (ca. 40 g Trockengewicht).

Der Rohextrakt wird in 50 ml Methanol aufgenommen und an Lichroprep RP-18 25–40 µm (Säule: 400 × 100 mm; Fluß: 200 ml/min; Merck Prepbar) isokratisch mit Methanol/Wasser 6/4 chromatographiert. Die Epothilone enthaltenden Fraktionen ( $R_f$ , ca. 95–125 min) werden durch RP-18 Niederdruckchromatographie aufgereinigt. (Säule 400 × 60: HD-Sil-18-20-60, Labomatic; Laufmittel: Methanol/Wasser 65/35; Fluß 25 ml/min;  $R_f$  Epothilon A: 140–165 min;  $R_f$  Epothilon B: 170–195 min).

Die Feinreinigung der Epothilone erfolgt durch Kristallisation aus

1. Epothilon A: Toluol/Ethylacetat = 3 : 2
2. Epothilon B: Ethylacetat

#### Epothilon A

$C_{26}H_{39}NO_6S[493]$   
FAB-MS (neg. Ionen): 429.25 für  $(M-H)^-$

$^1H$ -NMR-Daten s. Tab. 1

$^{13}C$ -NMR-Daten s. Tab. 2

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Itran:

$\nu$ : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm $^{-1}$

DC:  $R_f$  = 0.75

DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Lösung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120°C. braune Anfärbung

HPLC:  $R_f$  = 5.4 min

Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

#### Epothilon B

$C_{27}H_{41}NO_6S[507]$   
FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für  $(M-H)^-$

$^1H$ -NMR-Daten s. Tab. 1

$^{13}C$ -NMR-Daten s. Tab. 2

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Itran:

$\nu$  = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm $^{-1}$

DC:  $R_f$  = 0.75

DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion:

1. UV-Lösung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120°C. braune Anfärbung

HPLC:  $R_f$  = 6.3 min

Säule: 4 × 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

5  
93176369

DE 41 38 042 A1

Tabelle I

<sup>1</sup>H-NMR-Daten der Epothilone A und B

| S  | Atom | A        | B       |
|----|------|----------|---------|
| 10 | 2a   | 2.4 dd   | 2.22 dd |
|    | 2b   | 2.52 dd  | 2.53 dd |
|    | 3    | 4.19 dd  | 4.24 dd |
|    | 6    | 3.2 m    | 3.28 m  |
|    | 7    | 3.78 dd  | 3.75 dd |
|    | 8    | 1.73 m   | 1.73 m  |
| 15 | 9a   | 1.4 m    | 1.4 m   |
|    | 9b   | 1.52 m   | 1.5 m   |
|    | 10a  | 1.4 m    | 1.4 m   |
|    | 10b  | 1.4 m    | 1.4 m   |
|    | 11a  | 1.42 m   | 1.42 m  |
|    | 11b  | 1.7 m    | 1.7 m   |
| 20 | 12   | 2.9 ddd  | -       |
|    | 13   | 3.01 ddd | 2.8 dd  |
|    | 14a  | 1.85 ddd | 1.9 ddd |
|    | 14b  | 2.11 ddd | 2.1 ddd |
|    | 15   | 5.41 dd  | 5.41 dd |
| 25 | 17   | 6.6 s    | 6.6 s   |
|    | 19   | 6.99 s   | 6.99 s  |
|    | 21*) | 1.08 s   | 1.05 s  |
|    | 22*) | 1.35 s   | 1.36 s  |
| 30 | 23   | 1.15 d   | 1.15 d  |
|    | 24   | 0.93 d   | 0.92 d  |
|    | 25   | 2.05 s   | 2.05 s  |
|    | 26   | 2.69 s   | 2.69 s  |
|    | 27   | -        | 1.28 s  |

\*) Zuordnung vertauschbar

6  
93176369

Tabelle 2

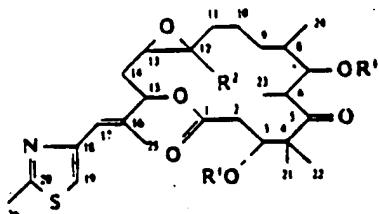
<sup>13</sup>C-NMR-Daten der Epothilone A und B

| Atom | A     | B     |    |
|------|-------|-------|----|
| 1    | 170.5 | 170.5 |    |
| 2    | 39.1  | 39.4  |    |
| 3    | 73.2  | 72.9  | 10 |
| 4    | 53.0  | 53.2  |    |
| 5    | 219.9 | 219.8 |    |
| 6    | 43.5  | 43.1  |    |
| 7    | 74.7  | 74.3  |    |
| 8    | 36.4  | 36.6  | 15 |
| 9    | 30.7  | 30.9  |    |
| 10   | 23.6  | 22.5  |    |
| 11   | 27.6  | 32.3  |    |
| 12   | 57.4  | 61.3  |    |
| 13   | 54.6  | 61.7  | 20 |
| 14   | 31.7  | 32.4  |    |
| 15   | 76.8  | 76.9  |    |
| 16   | 137.4 | 137.5 |    |
| 17   | 120.1 | 120.0 |    |
| 18   | 152.1 | 152.1 |    |
| 19   | 116.3 | 116.2 |    |
| 20   | 165.0 | 165.1 |    |
| 21*) | 20.4  | 19.7  |    |
| 22*) | 21.5  | 21.5  |    |
| 23   | 14.1  | 13.7  | 30 |
| 24   | 17.1  | 17.1  |    |
| 25   | 15.6  | 15.7  |    |
| 26   | 19.1  | 19.0  |    |
| 27   | -     | 22.7  | 35 |

\*) Zuordnung vertauschbar

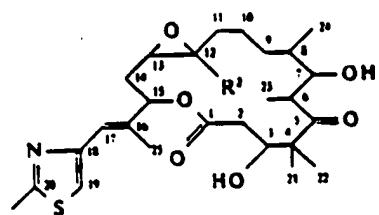
## Patentansprüche

## 1. Epothilone der allgemeinen Formel:



worin R<sup>1</sup> Wasserstoff, C<sub>1</sub>–C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>–C<sub>4</sub>-Acyl, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, 1/2 Mg<sup>2+</sup> oder 1/2 Ca<sup>2+</sup> bedeutet und R<sup>2</sup> Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

## 2. Epothilone der allgemeinen Formel:



worin R<sup>2</sup> Wasserstoff oder Methyl ist.

## DE 41 38 042 A1

3. Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

|    | <sup>1</sup> H-NMR-Daten |      | <sup>13</sup> C-NMR-Daten |       |
|----|--------------------------|------|---------------------------|-------|
|    | Atom                     |      | Atom                      |       |
| 5  | 2a                       | 2.4  | 1                         | 170.5 |
|    | 2b                       | 2.52 | 2                         | 39.1  |
|    | 3                        | 4.19 | 3                         | 73.2  |
| 10 | 6                        | 3.2  | 4                         | 53.0  |
|    | 7                        | 3.78 | 5                         | 219.9 |
|    | 8                        | 1.73 | 6                         | 43.5  |
|    | 9a                       | 1.4  | 7                         | 74.7  |
|    | 9b                       | .52  | 8                         | 36.4  |
| 15 | 10a                      | 1.4  | 9                         | 30.7  |
|    | 10b                      | 1.4  | 10                        | 23.6  |
|    | 11a                      | 1.42 | 11                        | 27.6  |
|    | 11b                      | 1.7  | 12                        | 57.4  |
|    | 12                       | 2.9  | 13                        | 54.6  |
| 20 | 13                       | 3.01 | 14                        | 31.7  |
|    | 14a                      | 1.85 | 15                        | 76.8  |
|    | 14b                      | 2.11 | 16                        | 137.4 |
|    | 15                       | 5.41 | 17                        | 120.1 |
|    | 17                       | 6.6  | 18                        | 152.1 |
| 25 | 19                       | 6.99 | 19                        | 116.3 |
|    | 21*)                     | 1.08 | 20                        | 165.0 |
|    | 22*)                     | 1.35 | 21*)                      | 20.4  |
|    | 23                       | 1.15 | 22*)                      | 21.6  |
|    | 24                       | 0.93 | 23                        | 14.1  |
| 30 | 25                       | 2.05 | 24                        | 17.1  |
|    | 26                       | 2.69 | 25                        | 15.6  |
|    |                          |      | 26                        | 19.1  |

\*) Zuordnung vertauschbar.

35 C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>6</sub>S(493)  
FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für (M-H)<sup>-</sup>  
UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log c) = 210 (4.17); 249 (3.97)

40 IR Film auf Irran:  
v: 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm<sup>-1</sup>  
DC: R<sub>f</sub> = 0.75  
DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:  
Dichlormethan/Methanol = 90 : 10  
Detektion:  
1. UV-Lösung bei 254 nm  
2. Ansprühen mit Vanilin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120°C. braune Anfärbung

45 HPLC: R<sub>t</sub> = 5.4 min  
Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck;  
Fluß: 1.5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35  
Detektor: UV 254 nm

50 4. Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

55

60

65

93176369<sup>8</sup>

## SECTION D: FORMULES, PURIFICATIONS, ETC.

DE 41 38 042 A1

| 'H-NMR-Daten<br>Atom |         | 'C-NMR-Daten<br>Atom |       |
|----------------------|---------|----------------------|-------|
| 2a                   | 2.22 dd | 1                    | 170.5 |
| 2b                   | 2.53 dd | 2                    | 39.4  |
| 3                    | 4.24 dd | 3                    | 72.9  |
| 6                    | 3.28 m  | 4                    | 53.2  |
| 7                    | 3.75 dd | 5                    | 219.8 |
| 8                    | 1.73 m  | 6                    | 43.1  |
| 9a                   | 1.4 m   | 7                    | 74.3  |
| 9b                   | 1.5 m   | 8                    | 36.6  |
| 10a                  | 1.4 m   | 9                    | 30.9  |
| 10b                  | 1.4 m   | 10                   | 22.5  |
| 11a                  | 1.42 m  | 11                   | 32.3  |
| 11b                  | 1.7 m   | 12                   | 61.3  |
| 12                   | -       | 13                   | 61.7  |
| 13                   | 2.8 dd  | 14                   | 32.4  |
| 14a                  | 1.9 ddd | 15                   | 76.9  |
| 14b                  | 2.1 ddd | 16                   | 137.5 |
| 15                   | 5.41 dd | 17                   | 120.0 |
| 17                   | 6.6 s   | 18                   | 152.1 |
| 19                   | 6.99 s  | 19                   | 116.2 |
| 21*)                 | 1.05 s  | 20                   | 165.1 |
| 22*)                 | 1.36 s  | 21*)                 | 19.7  |
| 23                   | 1.15 d  | 22*)                 | 21.5  |
| 24                   | 0.92 d  | 23                   | 13.7  |
| 25                   | 2.05 s  | 24                   | 17.1  |
| 26                   | 2.69 s  | 25                   | 15.7  |
| 27                   | 1.28 s  | 26                   | 19.0  |
|                      |         | 27                   | 22.7  |

(R' = CH<sub>3</sub>)

\*) Zuordnung vertauschbar

C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>6</sub>S[507]FAB-MS(neg. Ionen): 506.25 für (M-H)<sup>-</sup>UV (MeOH)λ<sub>max</sub> (log ε) = 210(4.17); 249(3.97)

IR Film auf Irtran:

ν = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm<sup>-1</sup>DC: R<sub>f</sub> = 0.75DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:  
Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion:

1. UV-Lösung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120°C, braune Anfärbung

HPLC: R<sub>t</sub> = 6.3 min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7 µm, Merck:

Fluß: 1.5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

5. Verfahren zum Herstellen von Epothilonen nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man den Stamm So ce90

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und
- die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreinigt und voneinander trennt.

6. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen gemäß einem der voranstehenden Ansprüche oder eines oder mehrerer dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmitte(n).

7. Mittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Fungizid oder Fungistatikum ist.

93176369

DE 41 38 042 A1

8. Therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann; bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder diese Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

10

93176369

50.degree. and the reaction mixt. was adjusted to pH 7 with 1 M phosphate buffer to give 2 isomers, each in 19% yield.

L4 ANSWER 14 OF 15 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS  
ACCESSION NUMBER: 1997:443365 CAPLUS  
DOCUMENT NUMBER: 127:81289  
TITLE: Preparation of epothilone derivatives as agrochemicals and pharmaceuticals  
INVENTOR(S): Hofle, Gerhard; Kiffe, Michael  
PATENT ASSIGNEE(S): Gesellschaft Fur Biotechnologische Forschung Mbh (Gbf), Germany; Hofle, Gerhard; Kiffe, Michael  
SOURCE: PCT Int. Appl., 38 pp.  
DOCUMENT TYPE: Patent  
LANGUAGE: German  
FAMILY ACC. NUM. COUNT: 2  
PATENT INFORMATION:

| PATENT NO.                                                                | KIND | DATE     | APPLICATION NO. | DATE     |
|---------------------------------------------------------------------------|------|----------|-----------------|----------|
| WO 9719086                                                                | A1   | 19970529 | WO 96-EP5080    | 19961118 |
| W: JP, US                                                                 |      |          |                 |          |
| RW: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE    |      |          |                 |          |
| DE 19542986                                                               | A1   | 19970522 | DE 95-19542986  | 19951117 |
| DE 19639456                                                               | A1   | 19980326 | DE 96-19639456  | 19960925 |
| EP 873341                                                                 | A1   | 19981028 | EP 96-939097    | 19961118 |
| R: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE, MC, PT, IE, FI |      |          |                 |          |
| PRIORITY APPLN. INFO.:                                                    |      |          | DE 95-19542986  | 19951117 |
|                                                                           |      |          | DE 96-19639456  | 19960925 |
|                                                                           |      |          | WO 96-EP5080    | 19961118 |

OTHER SOURCE(S): MARPAT 127:81289  
AB The title compds., e.g., I [R = H, C1-4 alkyl; R1, R2 = H, C1-6 alkyl, C1-6 acyl, benzoyl, C1-4 trialkylsilyl, benzyl, Ph, C1-6 alkoxy, C6 alkyl-, hydroxy-, and halo-substituted benzyl or phenyl; X, Y = H, halo, pseudohalo, OH, acyloxy, alkoxy, benzyloxy; or YZ = O, bond; however, I may not be epothilone A or B], useful as agrochems. and pharmaceuticals (no data), are prep'd. Thus, epothilone A in acetone contg. trifluoroacetic acid was heated overnight at 50.degree. and the reaction mixt. was adjusted to pH 7 with 1 M phosphate buffer to give 2 isomers, each in 19% yield.

L4 ANSWER 15 OF 15 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS  
ACCESSION NUMBER: 1994:52841 CAPLUS  
DOCUMENT NUMBER: 120:52841  
TITLE: Epothilone derivatives  
INVENTOR(S): Hoefle, Gerhard; Bedorf, Norbert; Gerth, Klaus; Reichenbach, Hans  
PATENT ASSIGNEE(S): Gesellschaft fuer Biotechnologische Forschung mbH (GBF), Germany  
SOURCE: Ger. Offen., 10 pp.  
DOCUMENT TYPE: Patent  
LANGUAGE: German  
FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1  
PATENT INFORMATION:

| PATENT NO.                                                     | KIND                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | DATE     | APPLICATION NO. | DATE     |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------------|----------|
| DE 4138043                                                     | A1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 19930527 | DE 91-4138042   | 19911119 |
| DE 4138042                                                     | C2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 19931014 |                 |          |
| WO 9310121                                                     | A1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 19930527 | WO 92-EP2656    | 19921119 |
| W: AU, CA, FI, HU, JP, KR, NO, US                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |          |                 |          |
| RW: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |          |                 |          |
| AU 9229437                                                     | A1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 19930615 | AU 92-29437     | 19921119 |
| PRIORITY APPLN. INFO.:                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |          |                 |          |
| DE 91-4138042 19911119                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |          |                 |          |
| WO 92-EP2656 19921119                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |          |                 |          |
| OTHER SOURCE(S): MARPAT 120:52841                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |          |                 |          |
| AB                                                             | Fungicidal antibiotic epothilones I ( $R_1 = H$ , alkyl, acyl, Li, etc.; $R_2 = H$ , Me) and a fermentative process for their prepn. are claimed. The process for their prepn. comprises the fermn. of Sorangium cellulosum in the presence of a resin. During the fermn. epothilon A ( $R_1 = R_2 = H$ ) and epothilone B ( $R_1 = H$ ; $R_2 = Me$ ) are bound to the resin. Agrochem. fungicides contg. epothilone A and epothilone B |          |                 |          |